

【特許請求の範囲】

1. DNA又はRNA配列の決定方法であって、二本鎖DNA又は決定されるべきDNA若しくはRNA配列に相当する二本鎖RNA/DNAハイブリッドの各塩基対間の対化又は不對化のエネルギーを測定し、このエネルギーを予め求めた値と比較することの特徴とする方法。

2. DNA又はDNA/RNAハイブリッドの各塩基対間の不對化のエネルギーを、DNA又はDNA/RNAハイブリッドの各鎖の少なくとも一つの塩基を支持体に付着させ、かつ各塩基対が次々に不對化するように支持体を移動させるとともに、不對化に必要とされるエネルギーを各不對化について測定し、かつこのエネルギーを予め求めた値と比較することによって求めることを特徴とする請求項1に記載の方法。

3. DNA又はDNA/RNAハイブリッドの各塩基対間の対化のエネルギーを、DNA又はDNA/RNAハイブリッドの各鎖の少なくとも一つの塩基を支持体に付着させ、かつ各塩基対が対化するように支持体を一緒にするとともに、対化に必要とされるエネルギーを各対化について測定し、かつこのエネルギーを予め求めた値と比較することによって求めることを特徴とする請求項1に記載の方法。

4. 二本鎖部を含むDNA又はDNA/RNAハイブリッドを不對化するのに必要とする総エネルギーを測定し、この総エネルギーを対化標準配列に相当するこのエネルギーの限界値と比較することを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

5. 前記方法が未決定構成のDNA又はDNA/RNAハイブリッドの配列決定に使用され、予め求めた値がその環境に準じて各塩基対について予め測定されたことを特徴とする請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

6. 対化又は不對化の前に支持体に付着していない二本鎖DNA又はハイブリッドの末端を、共有的又は疑似共有的に結合することの特徴とする請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

7. 二本鎖DNA又はDNA/RNAハイブリッド配列を、二本鎖の不對化

の後に、再対化し、次いで再び数回引っ張って離して測定値を累積し、かつ信号／ノイズ比を増加することを特徴とする請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

8. DNA又はハイブリッドの各鎖をいくつかの隣接塩基により付着させることを特徴とする請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

9. DNA又はハイブリッドの鎖の一方の塩基の一つを可動表面に直接又は間接的に付着させること、DNA又はハイブリッドの他方の鎖の塩基を力センサーに付着させること、及び可動表面を動かして離すとともに塩基の不对化について力センサーにより測定される力の値を求めることを特徴とする請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

10. 塩基の一つを可動表面に間接的に付着させるために、その表面に付着させた磁石及び塩基に付着させた磁化性粒子を使用することを特徴とする請求項9に記載の方法。

11. 前記力センサーがアトミックフォース顕微鏡のレバーであり、可動表面がナノメータ移動装置であることを特徴とする請求項10に記載の方法。

12. 前記力センサーが磁石であり、その位置が磁場により制御されることを特徴とする請求項9～11のいずれか一項に記載の方法。

13. 前記力センサーが、レバーであるか、または膜を移動センサーと組み合わせたものであることを特徴とする請求項9～12のいずれか一項に記載の方法。

14. 予め支持体に付着させた、特異的配列の存在についての被試験DNA又はRNA試料を、それ自体支持体に付着させた前記特異的配列に相補的な配列を有する容器に配置すること、及びインキュベーション後、形成される可能性のある二本鎖DNA又はDNA/RNAハイブリッド間の結合のエネルギーを測定して、総ハイブリダイゼーションの不对化のエネルギーに相当する特異的DNA配列の存在を検出することを特徴とする請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

15. 未知のDNAの配列決定に関する請求項1～14のいずれか一項に記

載の方法の適用。

16. 試験試料における特定のDNA配列を明かにするための請求項1～14のいずれか一項に記載の方法の適用。

17. 請求項1～14のいずれか一項に記載の方法を実施するための診断キットであって、以下の要素を一つ以上を含むことを特徴とする診断キット：

— 公知のヌクレオチド配列（又は「プライマー」）であって、前記配列のすべて又は一部分を含有する試験一本鎖DNA又はRNAと、ストリンジェント条件下、他の核酸を含有するかまたは前記非ハイブリダイゼーション性核酸を分離した後の反応媒体中でハイブリダイゼーションすることができる公知のヌクレオチド配列（又は「プライマー」）、

— 試料において求められているハイブリダイゼーション可能配列からなる参照標準要素としての二本鎖形態のDNA又はRNA、

— 試験試料のDNA若しくはRNA又はプライマーのDNA若しくはRNA（「公知のヌクレオチド配列」）が付着できる支持体、

— 少なくとも一種の制限酵素、

— 試験DNA又はRNAの末端を官能化するためのオリゴヌクレオチド、又はすでに官能化されたプライマー、

— ハイブリダイゼーションされるDNA若しくはRNA又はプライマーの官能

化末端に付着できる表面。

18. 請求項1～14のいずれか一項に記載の方法の実施において及び請求項15又は16に記載の適用において、又は請求項17に記載に診断キットの構成要素として有用である中間体としての、通常隣接5'及び3'端が、一つの場においてループの形態でオリゴヌクレオチドにより共有的又は疑似共有的に結合され、他方の場合において、一つ以上の別個の固体支持体に結合されている二本鎖DNA。

【発明の詳細な説明】

DNA配列の迅速決定方法、並びに配列決定及び診断への適用

本発明は、特に未知のDNA又はRNAの配列決定や、診断のための特異的DNA又はRNA配列の検出に有用な、核酸、DNA又はRNAの配列の迅速決定方法に関する。

DNA配列決定は、分子生物学の主要目的であり、ヒトゲノム配列決定プロジェクトの中心をなしている。

さらに、生理学的試料中の特異的DNA配列の存在を明かにすることは、現在、診断方法の開発の主要ラインを構成している。免疫学的手法の後、現在では、それに変わって、特に抗生物質耐性（Nature、1992、358、第591頁参照）、遺伝的異常、遺伝的変性に関連した癌並びにウイルス感染、例えばHIV又は肝炎ウイルスに関連した感染の危険を防止するために、DNA自体の変性を示す診断方法が注目されつつある。

これらの診断方法は、現在では、プローブと試料を直接ハイブリダイゼーションすることによりこの配列の存在を検出する、いわゆる「直接ハイブリダイゼーション」法を含んでなる。この方法は、特に、ゲル及び感光性フィルムへの暴露又は放射性カウントによる検出が必要であるので、めんどろであり且つ不正確である。

増幅を用いた方法、特にハイブリダイゼーションにより配列を明かにする前に、最初に、例えばプライマー及びポリメラーゼを用いてDNAの対応部を増幅するPCR法は、汚染に対して過剰に敏感である。

さらに、これらの方法は、所望の配列がプローブの使用を介してのみ認識されるので間接認識システムである欠点を有している。

本発明による方法により、必要に応じてハイブリダイゼーション又はスクレオチド配列を明かにすることができる。したがって、先入観や不明確な点が入り込む余地はない。この重要な進歩は、初めて、例えばプローブを用いて間接的に所望の配列のスクレオチド構造を明かにするのとはほとんど同じ速度で直接的に明かにできることによる。

本発明の方法の結果により、2つの相補的配列間のハイブリダイゼーションを、この配列の完全配列決定を要することなく直接的に明かにすることさえも可能である。

核酸配列決定は、現在では、生物学者において周知のSanger法により主に実施されている。この方法では、配列決定されるDNAを、まず切断して小さな断片(約5 kb)とした後、細菌株に挿入したプラスミドにクローニングする。このプラスミドを、この菌株で増幅し、抽出する。次に挿入DNAを、プラスミドプロモーターからコピーする。この転写は、ランダムな数のヌクレオチドを挿入した後中断する。この結果、初期DNAのすべての可能な中断コピーの集団を生じる。この集団は、数多くのコピーの分子量にしたがったゲル電気泳動により分離される。DNAに沿ったヌクレオチドの位置は、各DNA断片ごとにゲル上で直接読み取られる。

この方法は、極めて面倒である。約15,000塩基対(15 kbp)のDNAの場合、最終工程(プラスミドの抽出後)だけで、一週間かかる。その結果、DNAの配列決定は、本願の出願日時点で一塩基対当たり約5フランになることが一般的に言われている。

物理的及び電子処理に基づく本発明による方法は、化学的又は生物学的である現在の手法とは異なる。本発明の方法の利点は、非常に多い。

1) 短い配列も、極めて長い遺伝子(10 kbpを超える)の配列も現在の方法の場合のように小さく断片化する必要なく同様に十分に配列決定できる。

2) 10,000倍速い。現在の生物学的方法では、一週間で15,000塩基が配列決定できる。本発明の方法は、約100塩基を1秒、即ち、一週間で60,000,000塩基を配列決定できる。

3) DNAの必要量が、極めて少ない。

4) 容易に適合され、自由度が大きい。

5) 容易に自動化でき、配列決定信号がコンピュータにより直接処理できる。

6) 長くて面倒な生化学的操作を必要としないので、現在の手法よりもはるかに安価であることができる。配列決定時間がコストの決定的部分であるので、本

発明の方法は、少なくとも1, 000倍安価なはずである。

本発明は、DNA又はRNA配列の決定方法であって、二本鎖DNA又は決定されるべきDNA若しくはRNA配列に相当する二本鎖RNA/DNAハイブリッドの各塩基対間の対化 (pairing) 又は不對化 (分離: unpairing) のエネルギーを測定し、このエネルギーを予め求めた値と比較することを特徴とする方法に関する。

この方法には、いくつかの実施態様がある。第一の実施態様では、各測定エネルギーに、対応の隣接塩基の存在下での塩基対に相当する予め求めた値を当てはめることができる。これにより、当該DNA又はRNAのヌクレオチド配列が再構築される。

本発明の方法の第二の実施態様では、公知の配列の存在を明かにすることが求められる。この場合、この所望の配列の必須要件は、その「フィンガープリント」を作成するために、簡単に決定できることであり、次に決定されるDNA又はRNA試料が同じフィンガープリントを有するかどうかを確認するだけで十分である。

本発明の方法の第三の実施態様では、二本鎖DNA又は二本鎖DNA/RNAハイブリッドを不對化するのに必要とされる総エネルギーを測定し、この総エネルギーを、十分に対化された同じ配列に相当するこのエネルギーの限界値と比較

することにより、不對化のエネルギーが限界値未満である十分に対化されていないDNA/DNA又はRNA/DNA複合体を排除できる。当該「フィンガープリント」は、「総フィンガープリント」又は信号と称される。

本発明の方法の後者の2つの実施態様は、よりとりわけ診断用、即ち、公知の配列が存在するか存在しないかを明かにすることを意図するのに対して、第一の実施態様は、よりとりわけ配列決定に使用することを意図する。

「対化又は不對化のエネルギー」は、DNA又はDNA/RNAハイブリッドの2つの相補的鎖について対化される2つの塩基対を分離するか、再形成 (「再対化」) により回復するのに必要とするエネルギーを実質的に示すことが理解される。

本発明は、迅速且つ正確に二本鎖DNA又はDNA/RNAハイブリッドの各塩基対の結合力を測定し、そして特定の配列をこれらの値の各々に割り当てることのできることを実証に基づいている。上記結合力は、単に当該塩基対に依存するだけでなく、その環境、特に隣接塩基に依存し、且つ場合によっては、対化又は不對化が起きる実験条件にも依存する。

実際、DNAは、核酸アデニン、チミン、グアニン及びシトシンからなる二本鎖により形成される二重らせんであり、この結合は、一方では塩基対アデニン (A) /チミン (T) - 2 結合-及び対グアニン (G) /シトシン (C) - 3 結合-;並びに一方では、異なる塩基対の積層エネルギーによる結合により生じる。表1に、DNAに関する対応のエネルギーの観念を示す。これらのエネルギーは、塩基対及び隣接塩基によって顕著に異なることが分かる。この表に示した結果は、2つの隣接塩基から形成されたダイマーを不對化するための測定エネルギーに相当する。また、W. Saenger (Principles of Nucleic Acid structure 1988, Springer-Verlag 発行) による研究も参照できる。表における矢印は、DNAの読取り方向を表す。

表 1

ダイマー

エネルギー

 $(\text{kJ} \times \text{モル}^{-1} \times \text{ダイマー}^{-1})$

| | |
|--|--------|
| ↑ C.G G.C ↓ | -60.99 |
| ↑ C.G ↓ ↑ T.A ↓ A.T ↓ G.C ↓ | -43.93 |
| ↑ C.G ↓ ↑ A.T ↓ T.A ↓ G.C ↓ | -41.01 |
| ↑ G.C ↓ C.G ↓ | -40.50 |
| ↑ G.C ↓ ↑ C.G ↓ G.C ↓ C.G ↓ | -34.53 |
| ↑ T.A ↓ A.T ↓ | -27.46 |
| ↑ G.C ↓ ↑ A.T ↓ T.A ↓ C.G ↓ | -27.46 |
| ↑ G.C ↓ ↑ T.A ↓ T.A ↓ C.G ↓ | -28.34 |
| ↑ A.T ↓ ↑ T.A ↓ A.T ↓ T.A ↓ | -22.45 |
| ↑ A.T ↓ T.A ↓ | -15.97 |

本発明の方法には、2つの本質的な変更態様がある。

第一の実施態様では、DNA又はDNA/RNAハイブリッドの各塩基対間の

不對化のエネルギーを、DNA又はDNA/RNAハイブリッドの各鎖の少なくとも一つの塩基を支持体に付着させ、かつ各塩基対が次々に引き離されるように支持体を移動させるとともに、不對化に必要とされるエネルギーを各不對化について測定し、かつこのエネルギーを予め求めた値と比較することにより求める。

第二の実施態様では、DNA又はDNA/RNAハイブリッドの各塩基対間の対化のエネルギーを、DNA又はDNA/RNAハイブリッドの各鎖の少なくとも一つの塩基を支持体に付着させ、かつ各塩基対が対化するように支持体を一緒にするとともに、対化に必要とされるエネルギーを各対化について測定し、かつこのエネルギーを予め求めた値と比較することにより求める。

少なくとも一つの塩基による支持体への各DNA鎖の付着は、前記塩基を前記支持体に直接付着させることにより実施できるだけでなく、例えば、ペプチド又は不活性炭素鎖であることができるアームを介して間接的に付着させることにより前記支持体の表面に関連した影響を回避することもできる。

また、DNA又はRNAのセグメンをいくつかの塩基により支持体に付着することもできる。

最後に、DNAの各鎖を隣接塩基によって付着することが好ましいであろうが、ある場合には、とりわけ「総フィンガープリント」に相当する信号のみが求められるときには、各DNA鎖を、反対末端に位置する塩基により付着してもよい。

当然のことながら、用語「対化又は不對化のエネルギー」を使用する時には、このエネルギーを、直接的にか、変数により間接的に求めることになることが理解されなければならない。後者は、特に対化又は不對化の力（特に重力又は磁力）又は時間若しくは温度であることができる。これらの変数のいくつかは、バネ又は膜の移動に関連させるか、ある場合には電氣的若しくは磁氣的パラメータの変

化に関連させることができる。

もし二本鎖DNAを本発明の面から概略して表すことが望まれるのならば、それを開く(opened) (又は閉じる(closed)) とともに、各要素に関して不對化(又

は対化)に使用されるエネルギーを測定する「ジッパー」にたとえることができる。

本発明による方法は、種々の用途に使用できる。

まず最初に、未知の核酸の直接配列決定に使用できる。この場合、対化及び不對化のエネルギーの予め求めた値を、それらの環境に準じて各塩基対について予め測定し、次いで、可能性のある塩基の一つを、測定エネルギーに応じて各不對化又は対化に直接割り当てる。

この種の配列決定では、二本鎖を引き離した後、再びそれらを再対化し、その後再び結合エネルギーの値を測定してデータを蓄積することにより、バックグラウンドを減少させることが有利である。

また、再対化を容易にするために、二本鎖DNAに自由端を引き離す前に共有の又は疑似共有的に互いに結合するように構成して、特に対化と不對化のサイクルを行い、したがって、信号／ノイズ比を向上させることができるようにすることも可能である。

二本鎖DNAの自由端を互いに結合することができる手法は公知であり、その一部を、以下でより詳細に説明する。

また、本発明の方法は、診断目的に使用して、特に探索している異常に相当するDNAの変異領域の配列決定をすることもできる。この手法は、配列決定について上記したものと同様である。

しかしながら、力の値を、「フィンガープリント」又は信号の形態で記録し、塩基の順序及び性質を特別に測定することなく、探索しているフィンガープリント又は信号と比較する簡略化した手法を使用することもできる。もし探索してい

るフィンガープリントが異常の存在と対応するならば、他のいずれのフィンガープリントは陰性であると考えられ、これに対して、正常のDNAに対応するフィンガープリントを採用して、他のフィンガープリントはいずれも陽性であると考えられることもできる。

診断目的の場合、上記した方法のより簡単な変態様を使用できる。この場合、塩基対の不對化に必要なエネルギーを順次測定することはせず、2つのハイブ

リダイゼーションしたセグメントをこれらの末端を引っ張りながら不對化するの
に必要とする総エネルギーを測定する。このために、DNA/RNA試料に求め
られる標的配列に相補のプロープを、支持体に公知の方法によりグラフトする。
次に、試料の一本鎖DNA/RNAをプロープとハイブリダイゼーションし、そ
の後、その末端の一つを、適当な第二表面（例えば、磁気ビーズにストレプトア
ビジンをコートして、前にビオチニル化DNAとの疑似共有結合を可能にしたも
の）に固定する。2つのハイブリダイゼーションしたセグメントを「引き離す」
のに必要とする総エネルギーは、ハイブリダイゼーションの同定を可能とする「
フィンガープリント」として役立つ。

本方法の実施は、特に、以下の説明から明かとなるであろう力を直接測定でき
るアトミックフォース顕微鏡（atomic force microscope : A FM）の存在により
可能となった。

アトミックフォース顕微鏡（AFM）は、種々の会社（Park、Digital 等）から市販されている装置であり、一般的に、レバーの端部に配置した極
めて微細な先端部で走査することにより表面を視覚化するのに使用される。

即ち、DNAを引っ張り、加わる力を測定するための最も簡単な手段は、アト
ミックフォース顕微鏡（AFM）を使用することにある。この場合、DNA分子
の末端の一方をAFMの先端部がレバーに付着させ、他端を、AFMの可動圧電
管にしっかりと固定した試料取り付け台表面に連結する。DNAを表面に付着す

ることを可能とするこれらの方法は公知であり、使用できる方法の一部を、以下
で再び触れる。

Bustamente等は、Science（1992、第258巻、第11
22頁）に、粘性及び磁力に基づいたDNAを伸長する異なる手段を用いた二本
鎖DNAの弾性を測定する方法を記載している。

この方法では、2つのDNA鎖が分離せず、そして空間的分解能が不十分（1
ミクロンのオーダー）であることから、この方法の原理をそのまま配列決定に適
用できない。

AFMの管に印加される電圧を変更することにより、管が移動し、したがって

、もしDNAを予めレバーに一方を付着させ、他方を支持体に付着させておくならば、それでDNAの末端の一方を引っ張ることができる。対化塩基に課するけん引力がAFMのレバーに伝達され、そのたわみにより、この力を正確に測定できる。AFMのレバーの典型的な弾性定数が約 $3 \times 10^{-2} \text{ N/m}$ であり、そしてレバーのたわみの測定における正確さが、例えば0.2オングストロームに到達できるので、測定力の精度は鎖間対化力（水素結合により生じる）よりも約100倍低い $0.6 \times 10^{-12} \text{ N}$ よりもよい。これについては、J. N. Israelachvili (Intermolecular and Surface Force, Academic Press発行、1985) に記載の論文を参照できる。AFMはこの種の力を測定するための有用な道具であるが、必須ではなく、容量性検出法等の力測定 of the いくつか他の感受性法により置き換えるか、磁気浮揚による方法により置き換えてもよい。後者の方法による力の測定は、B. Gauthier-Manuel, Europhys. Conf. 14C, C34, (1990) により記載されている。

以下の説明は、AFMについて行うが、いずれか他の装置に適合させてもよい。

DNA分子に沿った塩基対の周期性は3.4オングストロームであり、疑似効果の影響を制限できる。DNA鎖の2つの隣接末端を引っ張ると、測定力はDNAにおける核酸の配列に反映する鎖間結合力により変調された周期成分（周期約6.8オングストローム）を有するであろう。したがって、この周期成分は、公知のDNA又はRNA配列でのこれらの変調の校正後DNAの配列決定に使用できるだけでなく、疑似効果を除去できる。

実際、レバーのけん引力は、DNAの巻き戻しによるけん引力に加えて、種々の疑似効果（例えば、レバーと表面との間のファンデルワールス力等）に依存する。しかしながら、レバー上のDNA分子のけん引力のみは、周期約6.8オングストロームで周期的である。信号濾過法により、種々の周波数を有する疑似効果を除去できる。公知のDNA配列について測定した力信号を一度だけ校正することにより、周期力の振幅とDNA配列との間の対応が確立される。次に、周期

信号の振幅を使用して、未知のDNA断片の配列決定できる。けん引サイクルの最後で、分子は表面に固定されたままであるので、2つの鎖を一緒にした時（「ジッパーを閉じる」）の塩基対の再対化に由来する周期力信号を測定することもできる。即ち、伸張／一緒にする（けん引／緩和）のサイクルを反復することにより、信号／ノイズ比及び配列決定の信頼性を向上できる。

最後に、上記で指摘したように、利用するエネルギーを変化させるために、方法の実施条件、とりわけ対化及び不對化が起こる媒体の条件を変化させることが可能である。即ち、pH、温度、イオン強度又は添加する生成物の性質を変更することにより、同じ塩基対に利用されるエネルギーの値を変更することができる。この場合、勿論、校正のために同じ条件下で参照測定を行うことが必要のことがある。しかしながら、ある場合には、校正値は、計算、又はノモグラム若しくは表を用いて得ることもできる。

DNAを表面又は支持体に付着するために、当該技術分野において公知の方法のいずれかを使用することができる。これらの方法は、実質的に2つの方法に分

類できる。

1) 直接法

この方法では、DNAは、支持体、例えばAFMの先端部に直接固定された状態になる。これには、この表面の機能化、例えば、DNAの機能化末端と反応できるストレプトアビジン、COOH基等による表面のコートによる機能化が含まれる。

2) 間接法

DNAを、粒子、例えば適当な粉末又はマイクロビーズ（適当な場合には、磁性）に固定し、次いでそれ自体を、支持体、例えばAFMのレバーに連結する。この連結を可能にする方法の一つは、レバーの磁化からなる。これは、種々の直接法か、小さな磁石をその端部に粘着させることにより行うことができる。間接法により、特に可逆カップリングが可能となる。十分激しく引っ張ると、マイクロビーズがレバーから分離され、レバーは自由になって新たなマイクロビーズをカップリングできる。

この方法により、DNA分子を次々と測定表面（AFMのレバー）にカップリングする（可逆的に）ことにより、DNA分子（すでに可動性支持体に固定されている）の不均一集団を連続して配列決定するか試験できる。

直接法では、一般的に、DNA又はRNA、とりわけ3'及び5'端機能化すること、即ち、それらに適当な化学基をグラフトすることが必要である。さらに、ループにより分子の他の2つの自由端を接合して、鎖が操作の終りで分離するのを防止することにより、必要に応じて後者を反復できるようにするのが好ましい。このために、異なる方法を採用できる。

最も簡単なのは、合成オリゴヌクレオチドを用いて、二本鎖DNAの末端の一つを、2つの異なる官能基（例えば、ビオチン及びアミン）で官能化して、2つの異なる前処理表面に固定できるようにすることである。二本鎖の他端を、ループ

の形態で部分的に対化された合成ヌクレオチドを用いて結合してよい。このように、対化した一本鎖DNAを二本鎖DNAから生成できる（第2a図参照）。この方法の利点は、（遺伝子又は染色体の分別化により得られるような）大きなDNA断片の不均一集団を機能化する能力による。これにより、同時分析が可能となる。この場合、DNA試料を、全ての断片で同じである末端に2つの異なる制限部位を有する副集団を得ることを可能にする二種（又はそれ以上）の制限酵素を用いて分別化する。これにより、2つの末端が異なるように処理（例えば、末端に適当な制限部位を有するループの形態のオリゴヌクレオチドによりそのうちの一つを接合することにより）できる。この方法の欠点は、2つの隣接官能基間の立体干渉である。これにより、表面のカップリングが困難となる。

この問題は、以下の方法により解決できる：

二本鎖DNA（ここでは、 a/a' で表す）を、第2（b）図に概略示すように、鎖の末端に相補的オリゴヌクレオチドを付加することにより、ダイマー $a/a'/a'/a$ に転化する。このために、2つのDNA集団 a/a' が考えられる。一つには、鎖 a の5'端を反応基Aで官能化し、その3'端をオリゴヌクレオチド b で官能化する。他では、鎖 a' の3'端をAとは異なる反応基Bで官能化し、その5'端を $b:b'$ に相補的なオリゴヌクレオチドで官能化する。これらの2

つの集団のハイブリダイゼーション及び結合により、DNA $a b a' / a' b'$ a を生成する。このうちの鎖 ($a b a'$) の一つはその末端の両方で2つの異なる反応基A及びBで官能化されており、2つの異なる表面に固定できる。

前記の方法と同様の構成を得るためには、二本鎖 ($a a'$ 及び $a' a$) を、例えば、DNAを変性することにより分離しなければならない。一本鎖DNA ($a a'$) (両方の表面にカップリングしている) のダイマーの2半分は相補的であるので (構成により)、最初のDNA (a / a') と同様に自然に対化する (第1(a)図参照)。表面の一つを動かすことにより、DNAを解き (「ジッ

パーを開く」)、他の表面に加わった固定した力を測定する。

実際の固定法に関して、数多くの手法があり、これらは、巨大分子 (タンパク質、DNA等) を市販の前処理表面に固定するための手法に由来する。これらの手法のほとんどは、免疫試験用に開発され、タンパク質 (イムノグロブリン) を、タンパク質のカルボキシル ($-COOH$) 又はアミン ($-NH_2$) 末端と反応できる表面担持基 ($-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 等) に連結する。

DNAの共有固定は、第二アミン (Covalink-NH surface、ストラスプール、Polyabo製) と反応して共有結合を形成できる分子の5'端の自由ホスフェートを介して、直接達成できる。また、DNAをアミン基で官能化した後、タンパク質と同様にすることもできる。

また、ストレプトアビジンとビオチニル化DNA分子とを疑似共有固定できるストレプトアビジンコート表面 (Dynalビーズ等) もある。最後に、ジゴキシゲニンに対する抗体を表面にグラフトすることにより (上記した方法により)、ジゴキシゲニンで官能化したDNAを、そこに固定できる。この方法は、数多くの可能な固定法の一例にすぎない。

付着及び固定法には、例えば、セルロース等の固体支持体にDNAを付着させるための酵素的カップリングを用いたEP特許第152, 886号に記載されている手法も挙げられる。

EP特許第146, 815号にも、支持体にDNAを付着させる種々の方法が記載されている。

同様に、WO92/16659は、DNAを付着するためにポリマーを用いる方法を提案している。

当然のことながら、DNAを支持体に直接付着してよいが、必要に応じて、とりわけ表面の影響を制限するために、例えばEP特許第329,198号に記載されているように、DNAをペプチド又は他のものの不活性アームの端部に付着してよい。

また、本発明は、以下の構成要素の一つ以上を含む診断キットにも関する：

- 公知のヌクレオチド配列（又は「プライマー」）であって、前記配列のすべて又は一部分を含有する試験一本鎖DNA又はRNAと、ストリンジェント条件下、他の核酸を含有するかまたは前記非ハイブリダイゼーション性核酸を分離した後の反応媒体中でハイブリダイゼーションすることができる公知のヌクレオチド配列（又は「プライマー」）、

- 試料において求められているハイブリダイゼーション可能配列からなる参照標準要素としての二本鎖形態のDNA又はRNA、

- 試験試料のDNA若しくはRNA又はプライマーのDNA若しくはRNA（「公知のヌクレオチド配列」）が付着できる支持体、

- 少なくとも一種の制限酵素、

- 試験DNA又はRNAの末端を機能化するためのオリゴヌクレオチド、又はすでに官能化されたプライマー、

- ハイブリダイゼーションされるDNA若しくはRNA又はプライマーの官能化末端に付着できる表面。

また、本発明は、本発明の方法を校正するのに有用である中間体にも関する。この中間体は、通常隣接5'及び3'端が、一つの場合においてループの形態でオリゴヌクレオチドにより共有的又は疑似共有的に結合され、他方の場合に1つ以上の別個の固体支持体に結合されている二本鎖DNAである。

以下の例により、本発明の他の特徴及び利点が明かになるであろう：

添付図面において：

第1図は、アトミックフォース顕微鏡を用いた方法を示す図である。

第2図は、末端基でDNAを官能化する2つの方法の概略図である。

第3図は、ファージλ DNAに適用した2 (b) に記載のDNAダイマーの構成の概略図である。

第4図は、基質上約3と3 μ m間形成された磁気像である。像の底部の白色ビーズは直接接触（磁気引力）なしに観察され、一方、上部の黒色ビーズは直接接触（接触の反発力）により観察される。像化ビーズは、直径2.8 μ mである。

第5図は、ビーズ (a) 又は未反応基質 (b) の中心に対して垂直に力センサーを用いた手法を示す。磁場を印加する。各グラフにおいて、連続した曲線は、基質から数ミクロン離れた位置からの手法を表す。点で表した曲線は、リターンを表す。(a) において、磁気引力は、自体、曲線が大きく上に上昇する形で現れる。(a) 及び (b) において、反発力（接触による）は、自体、力の値が急速に低下する形で現れる。

第6図は、5分をわずかに超えるビーズの中心の運動を示す。上は、観察平面における運動であり、下は、Xにおけるビーズの位置の経時的タイムコースである。

第7図は、アトミックフォース顕微鏡を用いた伸張によるλ DNA分子の伸張図である。分子をほとんど完全に伸張した時、数nNのオーダーの力が加わってから破断する。

実施例 1

本実施例では、選択されるDNAは、ファージλ DNA (λ DNA) であり、このλ DNAは48502塩基対を含んでなり、この配列は公知である。このDNAの二本鎖a及びa'は、その線状（オープン）形態において、5'端に12不対塩基を有する。このDNAの末端は、第3図に概略して示すように、容易に官能化できる。このDNAの不对末端に相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、鎖aの5'端と、相補鎖a'の3'端は、一方の場合ではビオチニル化され、他方の場合ではアミノ化される。次に、合成オリゴヌクレオチドb及びb'（これらのDNAの自由端に部分的に相補的）を、対化し連結する。最後に、

二つのDNAを、ハイブリダイゼーションし連結する。オリゴヌクレオチドを太字で示し、それらの配列をイタリックで示す。

これを行った後、官能化DNAを、前処理したポリスチレンビーズ（主に、商品名（Estapor）でDynal及びRhône-Poulencにより市販されている）の表面に（ビオチン、アミン又はジゴキシゲニン基を介して）固定する。後者に、下記の材料と方法において記載するように、ビオチンに対して疑似共有結合親和性を有するストレプトアビジンか、ジゴキシゲニン（DIG）に対する別の抗体との結合を可能にするモノクローナル抗体か、あるいはアミン基（NH₂）と共有結合を形成するカルボキシル基（COOH）でコートする。

第1図に概略して示すように、DNAダイマー（aa'）の一本鎖を引っ張るために、その末端の一方を、アミン基Aでの官能化による連結を介して、前処理した平坦面αに固定し、他端は、ストレプトアビジンコートDynal磁気ビーズBに固定する。AFMのレバーの末端に粘着した小さな磁石により、レバーとDynalビーズとの間の結合が維持される。二本鎖a及びa'は相補的であるので、これらは部分的に対化する。表面αは速度vで駆動され、DNAについてのけん引力を、バネとして作用する表面βのたわみにより測定する（例えば、AFMのレバー）。DNAの塩基は、点Eで不对である。移動と力の測定は、AFMにより行うことができる。

実施例2

材料と方法

λDNAは、Boehringer-Mannheim製である。ファージラムダDNAのcos端に相補的なオリゴヌクレオチドを、合成した（オリゴ1：5'-AGGTCGCGCCGCCC-3' 12-mer；オリゴ2：5'-GGGCGCGACCT-3' 12-mer）。使用する全ての酵素は、Boehringer-Mannheim及びBio-Labs製である。

³²Pヌクレオチドは、Amersham製である。全ての磁気ビーズは、Dynal（Dynabeads M-280 ストレプトアビジン；Dynabeads M-450 ヒツジ抗ネズミIgG）製である。ラテックス粒子は、Rh

one-Poulenc (Estapor) 製である。抗DIGイムノグロブリン (モノクローナル抗体) は、Boehringer-Mannheim製である。Covalink NHモジュールは、Nunc製であり、異なるバッチのプレートを用いた。全ての試薬は、Sigma製である。標識物質は、P-6 スピнкаラム (Bio-Rad) で精製した。

DNAの末端の官能化

λ DNA分子の二末端を異なる方法で官能化するために、以下の方法を用いた。

1) 分子の末端のクレノー断片での標識

λ DNA 0.08 nmol (2.5 μg) を、その末端で、ピオチン-dUTP (又はDig-dUTP又はアミノ-dUTP) 2 nmol および放射性ヌクレオチド、dCTP又はdGTP (3000 Ci/mmol) の存在下で、クレノー断片2単位を用いて標識し、異なる反応の収率を評価する。反応は、末端の標識に標準の条件下で行う。標識DNAは、スピнкаラムにより、遊離ヌクレオチドから精製する。標識DNAを、制限酵素KAS I 4単位により37℃で4~6時間断片化して、2断片とする。2つの断片を、1.5%低融点アガロースで分離し、溶離し、Elutipカラムで濃縮した。これにより得られた断片は、二種の異なる末端を有している (一つは5'-ホスフェートを有し、別の末端は3' 端近くにピオチン、DIG又はアミノ基を有する)。これらは、下記で説明するようにして活性表面に結合するか、2つの断片を結合 (一つをピオチン (例えば) 末端と、他方は他末端のDIG基と) することによりダイマー構築に用いることができる。

2) 変性オリゴヌクレオチドによる末端の標識

λ DNAの2つのcos末端に相同のオリゴヌクレオチド10 nmol を、それらの末端で変性する。全てのオリゴヌクレオチドを、キナーゼ反応により5' 端でリン酸化する。オリゴヌクレオチド1 nmol を、37℃で3~4時間、ATP (γ-ATP³²-3000 Ci/mmol 16 pmol で放射性標識) 200 nmol およびT4ポリヌクレオチドキナーゼ10 μl の存在下でインキュベ

ーションする。5'端をリン酸化したこれらのオリゴヌクレオチドを、スピンカラムにより遊離ヌクレオチドから精製する。つぎに、これらの3'端を、ビオチン-dUTP、DIG-dUTP又はアミノ-dUTPを組み込むことにより変更した。5'端をリン酸化したオリゴヌクレオチド10 pmolを、37℃で1～2時間、ビオチン-dUTP、(DIG-UTP又はアミノ-dUTP)10 nmolと、デオキシトランスフェラーゼ末端酵素2単位の存在下でインキュベーションする。変更オリゴヌクレオチドを、スピンカラムにより、遊離ヌクレオチドから精製する。

これらの変更オリゴヌクレオチド2 pmolを、T4リガーゼ5単位の存在下で、16℃で12時間、反応容積200 µlで連結する。未連結オリゴヌクレオチドを、酢酸アンモニウム/イソプロパノール混合物中で2回逐次析出させることにより、標識DNAから分離する。DNAを、冷70%エタノールで清浄にし、"speed-vac"で乾燥し、蒸留水に懸濁した。

表面の固定

上記した官能化DNAは、市販の前処理表面と反応できる4つの異なる官能基(5'ホスフェート、ビオチン、DIG及びNH₂)を有することができる。

1) ストレプトアビジンコート表面へのビオチン基の固定

ストレプトアビジンコートDyna1M-280を、1xPBS溶液(pH7.4)+0.1%BSAで3回洗浄する。これらのビーズを、Dyna1磁気粒子コンセンレータで集め、TE溶液+NaCl 2 molに再懸濁し、変性

DNA(DNA分子/ビーズ比が異なる)とともに、室温で1～2時間ローテータ中でインキュベーションする。

2) 抗DIGコート表面へのDIGの固定

ヒツジ抗マウスIgGでコートしたDyna1M-450を、Dyna1により供給された情報に準じて清浄にする。ビーズ溶液100 ml(約 4×10^7 ビーズ)を、抗DIG IgG(約 10^{-10} mol)10 µgとともに、ローテータ中、4℃で12時間インキュベーションする。これらのビーズを、次にPBS/BSA溶液で清浄にし、PBSに再懸濁する。DIG標識DNAを、次にビー

ズ（比が異なる）とともに、ローテータ中で室温で4時間インキュベーションする。

3) COOH酸表面へのアミノ基の固定

COOH Estaporラテックス粒子（粒径1.1及び2 μ m）を、蒸留水で遠心分離により2回清浄にし、3-（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（CDI）で再活性化する。この工程を、清浄化ビーズ0.1mlを、CD10.1mgとともに、50℃で1時間インキュベーションすることにより行う。再活性化粒子を、モルホリノエタン硫酸[lacuna]（MES）の0.05mol溶液pH5.5で遠心分離することにより3回清浄にする。沈殿ビーズを、TPG（NaH₂PO₄・2H₂O 0.05mol; NaCl 0.1%; ゼラチン2%; pH6.6）100 μ lに再懸濁する。

ビーズは、次にタンパク質に存在するアミノ基及び変性DNAのアミノ基と共有結合を形成できる。ラテックス溶液（約10⁹ビーズ）100 μ lを、アビジン0.5mg（又はプロテインA0.5mg又はアミノ変性オリゴ20.25 μ mol）の存在下、50℃、1時間インキュベーション後、室温で12時間回転を継続する。連結ビーズを、次にTPG緩衝液で3回清浄にし、TPG100 μ lに再懸濁し、4℃で維持する。アビジンコートビーズを、上記したようにし

て、ピオチン変性DNAに連結する。プロテインAコートビーズを、抗体0.1mg/mlとともに、室温、12時間でインキュベーションすることにより、抗DIG IgGでコートする。最後に、上記したようにして、DIG変性DNAと連結する。

4) 第二アミン(NH) (Nunc Covalinkモジュール) で活性化した表面への5'リン酸基の固定

異なる量の λ DNA（50ng~0.005ng）を、1-メチルイミダゾール（1-MeIM）10mmol溶液75 μ lと0.2M 1-エチル-3-（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）25 μ lに溶解する。この溶液を、Nunc Covalinks ウェルに導入する。モジュールを、50℃で5~6時間インキュベーションした後、5xSSC、0.25%SDS溶液

(50℃に予備加熱)で3回洗浄にし、0.1xTEで3回洗浄にする。

ウエルの表面での予備活性ビーズの非特異的結合を回避するために、0.1%BSA溶液を添加し、室温で12時間インキュベーションする。ウエルを、0.1xTEで3~5回洗浄にする。ビオチン標識DNAを、NaOH溶液0.25mol/l中で変性して、ビオチン3'端を遊離させる。次いでストレプトアビジンコートM-280ビーズを、次に添加してビオチン末端と連結させて、室温で0.5時間インキュベーションする。未連結ビーズを、磁気的手段で採取する。5'ホスフェート末端によりウエルの表面に連結し、ビオチン標識3'端によりビーズ表面に連結したDNAは、この時点では、操作のため近くにある。

レバーの磁化

結合したM-280常磁性ビーズを選択的に回収するために、AFMレバーを、以下のようにして磁化する：マイクロニピュレータ(Leitz)の端部および顕微鏡(Reichert-Jung Polyvar)下でマイクロピペットを用いて、紫外線硬化接着剤(Norland Optical Adhesive)

v)の小さい一滴を、AFM(Park)片持ち梁(cantilever)の先端に付着させた。小磁気粒子(半径約7μm)(コバルトビーズ又はSmCo磁石粉末粒)を、マイクロピペットで取り、接着剤滴上に置き、UV照射を約20分間行なって重合させる。磁化レバーを用いて、Covalink表面に連結した粒子を回収し、倒立光学顕微鏡(Nikon)又はAFM(Park Scientific Instruments、米国)磁場に配置する。

実施例3

結果

長さ100~200μm、厚さ0.6μmの小さな弾性レバー(カンチレバー)から実質的になるアトミックフォース顕微鏡(AFM)を使用する。レバーの固定端の位置を、圧電管より試料に対して約10⁻¹¹mで制御する。可動端のたわみを光学的に測定することにより、加えられた力が10⁻¹²N付近の感度で検出できる。後端のAFMの通常のプロープ(曲率半径数10nmの窒化ケイ素

製先端部)を、直径7 μm の強磁性コバルトビーズで置き換えた。このアセンブリは、磁力センサーを構成する。この磁力センサーは、固体基材に結合した2.8 μm Dynal ビーズにより引き付けられて、バネのたわみを生じる。逆に、センサーが溶液中で Dynal ビーズを引き付けるか、部分的にDNA鎖の末端で遊離する。その時には、撓みがほとんどなく、ビーズがセンサーに自然に粘着する。第一の種類の相互作用は、AFMにより直接測定でき、第二の相互作用は、光学顕微鏡で視覚的に観察できる。

Dynal ビーズは、活性化基質(Nunc Covalink モジュール)に、直接生化学的結合によるか、非特異的付着によりしっかりと固定できる。この付着は、基質下数mmに位置する小磁石の場合勾配により強化される。接触限界で最大であるセンサーとビーズとの引力は、 $10^{-8} \sim 10^{-9} \text{ N}$ に到達する。磁場の不存在下で、相互作用(永久双極子誘発双極子)の範囲は、ビーズの直径

に対して極めて小さく、したがって測定困難である。これに対して、小さい場により誘発双極子が飽和することにより、範囲が増加して約4 μm に達成する。これにより、センサーによりビーズの1又は2 μm 上に位置する面を走査することにより像を得ることができる(第4図参照)。これにより、次に行われるビーズの極めて微細な局在化が可能となる。第5図は、ビーズ及び/又は未反応支持体の中央に関して垂直に行った方法を示している。(a)では、右から左に、ある距離での磁気引力後、センサーがビーズと接触することが分かる。(b)では、センサーと支持体との接触のみが検出される。場の不存在下では、顕著な引力はこのスケールでは観察されず、接触相互作用のみが観察される。

遊離ビーズを、AFMセンサーのコバルトビーズで顕微操作できる。これは、AFM自体下では、操作を監視するための光学的アクセスの不足のために現在のところ行うことができないが、倒立光学顕微鏡の分野でミクロマニピュレータに付属しているセンサーによりシミュレーションできる。倒立顕微鏡と一体化したAFMは、現在検討中である。遊離ビーズは、半径1又は2 μm 内でセンサーにより引き付けられ、そこに粘着されることが実質的に観察される。これは、本発明者等がビーズ-DNA系に適用する検出の最も原始的な手段である。2つのビ

ーズの結合力は、上記した磁氣的引力と、表面の状態に実質的に依存する接触力の合計である：この結合は、未反応センサーについてかなり強く容易には破壊できない。しかしながら、もしセンサーをウシ血清アルブミン（BSA）（約2%）の溶液に濡らすと、接触力が大きく減少し、ビーズが、センサーの突然の加速又は基質に対する軽い摩擦によって離れてしまう。

配列決定を目的としたDNAの分析のための操作装置は、典型的にはDNA分子をグラフトする透明基質（Nunc Covalink）付近に作成する。この基質は、基質を空間の三方向に移動させる圧電又は等価系にしっかりと固定される。磁力センサー（AFM）により定量測定でき、光学顕微鏡により、表面と

力センサーがそれらの相対移動において観察できる。最後に、このアセンブリーは、電磁石の場の中にあり、加わる場に応じて、表面にビーズを層状にすることにより磁気画像形成を可能としたり、ビーズを表面から遠ざけたり（未グラフトビーズを除去してオペレータの選択を容易にする）、場ゼロでDNAを自由に動き回らせて、センサーに粘着するようにすることができる。この構成では、力の定量測定及びDNAの配列決定を実施できる。

実施例4

本実施例では、けん引中の分子についての力の定量測定について説明する。

次の3つの条件を満足しなければならない：磁気ビーズをDNA分子によりガラス板に付着させること、ガラス板にビーズを結合する分子数を測定してビーズによって結合されるものを選択できること、そして最後にアトミックフォース顕微鏡（AFM）を用いて分子についてのけん引力を測定すること。

DNA分子のカップリングは、上記したものと類似のプロトコールに準じる。DNA分子の末端の各々の結合は、別個の工程で生じる。この目的は、単一分子の両末端がビーズかガラス表面に連結してループを形成するのを防止するためである。磁気ビーズを結合することが望ましい末端に、まずバイオチンを選択的にグラフトし、これが磁気ビーズを被覆しているストレプトアビジンに結合する。第二末端を、ジオキゲニン分子（DIG-dUTP）に付着し、抗DIG抗体（これにより前にプロテインAで処理したガラス板をコートした）と連結する。

DNA分子の伸張

ミクロマニピュレータを用いて、コバルトビーズからなる磁化先端部を近付けることにより、多数のビーズが捕獲され、固定点から15 μm の距離を超えて移動して離れることができないことが確認できた（これが、使用されるDNA分子の長さに正確に相当する）。

試料の特徴付け

試料の調製中に、ガラス板にビーズを結合するDNA分子数を変化できる。したがって、結合に関与する分子数を、後で測定しなければならない。この測定を干渉なしに実施できる装置が開発された：ビーズのブラウン運動を測定し、後者をガラス板に接合する分子数を、それから演繹する。実際、この分子数が大きいほど、ビーズがよりしっかりと表面に付着され、これらの変動の振幅がより小さい。ビーズを単一DNA分子により結合する場合に相当する観察される変動の様子を、第6図に再現する。

分子数を求めるために、 $\langle x^2 \rangle$ を測定し、以下の式を使用する：

$$n k \langle x^2 \rangle = k_B T$$

（式中、 k はDNA分子の剛さであり、 k_B はボルツマン定数であり、 T は温度であり、 n は分子数である。

DNA分子の破断

ミクロマニピュレータの先端に粘着したコバルトビーズの磁化を増加させることにより、次にビーズを15 μm よりもさらに遠くに移動させることによりDNA分子を破断できる。アトミックフォース顕微鏡を用いてこの実験を反復することにより、後者の分子の破壊時の分子の引張力を測定した（第7図）。

【图 1】

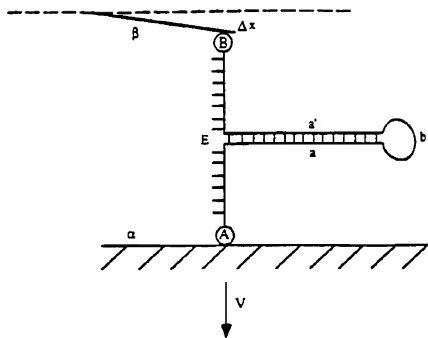


FIGURE 1

【图2】

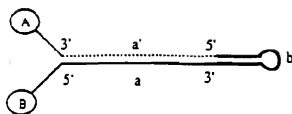


FIGURE 2A

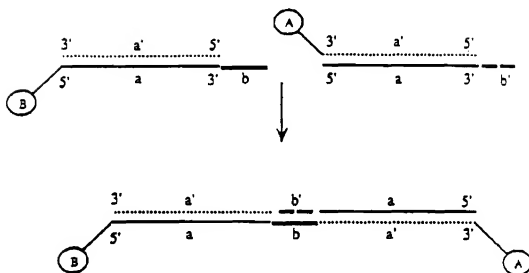


FIGURE 2B

【図3】

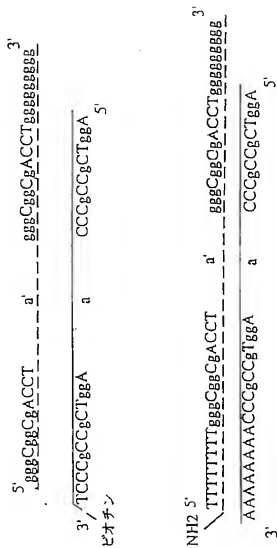


FIGURE 3

【図4】

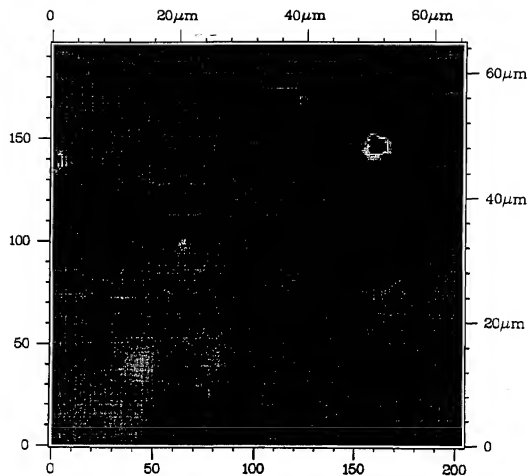


FIGURE 4

【図 5】

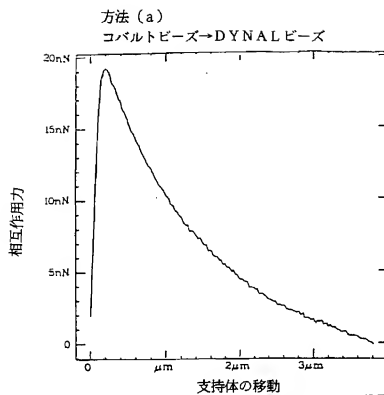


FIGURE 5A

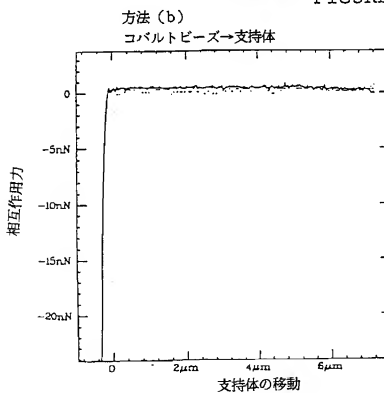


FIGURE 5B

【図 6】

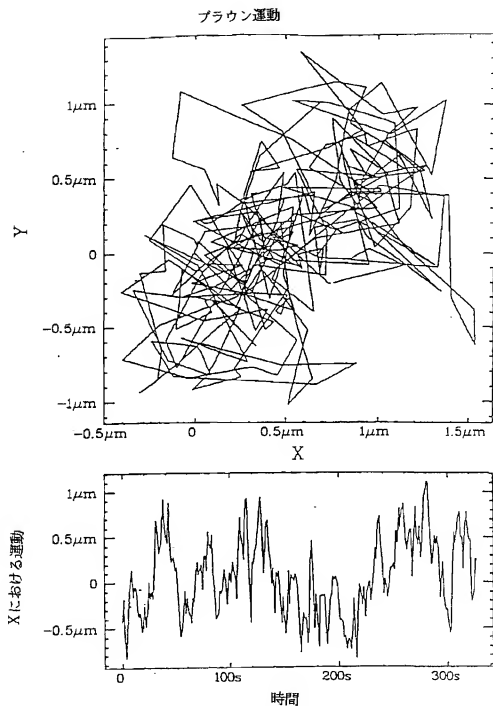


FIGURE 6

【図7】

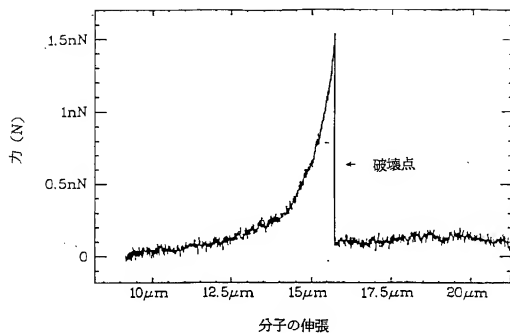


FIGURE 7

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| | | |
|---|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 5 C12Q1/68 G01N27/00 | | Date and Application No PCT/FR 94/00382 |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 5 C12Q | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | EP,A,0 397 416 (AMERSHAM) 14 November 1990 | |
| A | SCIENCE vol. 258, November 1992, LANCASTER, PA US pages 1122 - 1126 S.MITH ET AL. 'Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads' cited in the application | |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents: 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'B' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |
| 'I' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other cited documents, such combination being obvious to a person skilled in the art 'd' document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 8 July 1994 | | Date of mailing of the international search report 14.07.94 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 1818 Postfach 2 NL - 2280 HV Rijswijk Td. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-500 4 | | Authorized officer Molina Galan, E |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

フロントページの続き

- (72)発明者 ベンシモン, デビッド
フランス国パリ、アレ、マルク - シャガー
ル、 5
- (72)発明者 クロケット, バンサン
フランス国アントニ、リュ、ベルジル、 3
- (72)発明者 シフォーデル, アルノー
フランス国アントニ、アブニュ、エルネス
ト - ルナン、 17